

〈論 文〉

## 곤충소화액에서 *Bacillus thuringiensis*의 내독소 단백질의 분해

金英勳 · 金尙賢 · 姜錫權

서울대학교 農業生命科學大學 農業生物 新素材研究센터

### Degradation of the Parasporal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis* in Gut Juice of Some Insects

Young Hoon Kim, Sang Hyun Kim and Seok Kwon Kang

College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University,  
Research Center for New Bio-Materials in Agriculture Suwon, Korea

#### Abstract

Dissolution and degradation of the parasporal crystal proteins produced from *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, *B. thuringiensis*, var. *dendrolimus* and *B. thuringiensis* var. *aizawai* were investigated. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis analysis showed that the crystals contained major protein with molecular weight of approximately 134 kDa for *B. thuringiensis* var. *aizawai*, 143 kDa for *B. thuringiensis* var. *kurstaki* and 149 kDa for *B. thuringiensis* var. *dendrolimus*, respectively. Crystals of three other strains were incubated alkali solutions at various pH or gut juice of Silkworm *Bombyx mori*, Fall webworm *Hyphantria cunea*, and Common Cabbage worm *Pieris rapae*. When crystals of these strains were solubilized by alkali solutions, no major differences among strains *B. thuringiensis* could be detected. Among the strains studied, crystal proteins (130~66 kDa) consist of protease resistant polypeptides in the 45~66 kDa size range when treated with gut juice of three insect species.

**Keywords :** *Bombyx mori*, *B. thuringiensis*, crystal proteins

#### 緒 論

*Bacillus thuringiensis*에 의하여 생산된 내독소단백질(parasporal crystal proteins)은 인시목 곤충이 섭취하므로써 독성이 나타난다(Hannay, 1953). 이 내독소단백질(protein : 120~150 kDa)은 중성 용액에서는 용해되지 않으며 높은 알칼리성 용액 또는 곤충의 소화액에서 protein이 용해되어서 60~70 kDa의 저항성 독성 단백질이 형성되어 독성이 나타나는 것으로 보고하고 있다(Lecadet and Martouret, 1967;

Yamanoto and Laughim, 1981). Lecadet 및 Dedonder(1966)은 곤충소화액에 의하여 내독소가 용해되는 것을 예증하였다. 반면에 Faust 등(1967)은 알칼리 용액 속에서 용해되는 것을 보고하였다. 비록 이와 같이 *B. thuringiensis*의 내독소단백질의 연구가 많이 행하여 지고는 있으나 곤충소화액에서 일어나는 독성의 변화상태가 잘 알려져 있지 않다.

대부분의 연구자들은 내독소단백질을 알칼리 용액만으로 또는 알칼리 용액에 필요한 시약을 첨가하여 사용하였다. 한편 Locadet 및 Dedonder(1967)은 *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*의 내독소단백질이 *Pieris brassicae*의 소화액에 의하여 용해되었을 때 약

1991年度 教育部支援 서울대학교 遺傳工學研究所 學術研究助成費에 의해 研究된 것의 일부임.

10여개의 단백질 band가 나타나는 것으로 보고하였다.

이러한 관점에서 본 연구는 인시목 곤충에 강한 독성을 나타내는 *B. thuringiensis* var. *aizawai*, var. *dendrolimus* 그리고 var. *kurstaki* 등 3균주를 선택하여 내독소단백질이 알칼리 상태에서 어떻게 변화되어 가는가를 실험하였으며, 또한 곤충의 소화액에서 일어나는 변화상태를 관찰하기 위하여 농업해충인 배추흰나비(*Pieris rapae*) 및 흰불나방(*Hyphantria cunea*)의 소화액과 주요익충인 누에(*Bombyx mori*)의 소화액으로 결정체 독소단백질의 분해과정을 조사 분석하여 보고한다.

## 材料 및 方法

### 1. 균주 및 공시충

본 연구에 사용한 *B. thuringiensis* var. *aizawai*, *B. thuringiensis* var. *dendrolimus*, *B. thuringiensis* var. *kurstaki*의 균주는 미국 농무성의 Faust 博士로부터 분양받았다.

또한 공시충은 본 대학 곤충병리학 연구실에서 제대사육 중인 흰불나방(*Hyphantria cunea*)과 누에(*Bombyx mori*) 및 수원농가의 배추밭에서 채집한 배추흰나비(*Pieris rapae*) 등 3種의 昆蟲을 사용하였다.

### 2. 내독소의 분리 및 소화액 수집

균주로부터 내독소단백질의 분리는 김영훈 등(1991)이 보고한 방법에 의하여 분리하였다. 균주를 G.Y.S. 배지가 들어있는 500 ml Erlenmeyer flask에 접종하고 30°C, 96시간 배양하여 위상차현미경으로 포자와 내독소의 autolysis를 확인한 후 원심분리(10,000 g, 20분)하여 1M NaCl로 세척하였다. 각 공시균주의 내독소단백질의 분리는 Renograffin액을 이용하여 사진에 보고한 방법으로 분리하였다.

공시충으로부터 소화액의 분리는 누에를 1일간 굵식 중지하고 영냉중에서 Chloroform으로 처리하여 토액을 수집 filter paper로 여과한 후 4°C, 8,000 g, 10분간 원심하여 침전물을 제거한 뒤 상층액을 모아 -20°C 냉장고에 보관하였다.

한편, 배추흰나비와 흰불나방의 경우에는 충체가 작고 채취되는 소화액이 극히 미량이기 때문에 물리적 자극을 주어 나오는 토액을 구기로부터 직접 주사기로 흡입·채취 하였다.

### 3. 내독소단백질의 SDS-PAGE 분석

위에 서술한 방법으로 얻어진 內毒素蛋白質을 pH

가 다른 alkali 溶液 또는 곤충의 消化液으로 처리하여 분해되는 樣相을 調査하였다.

Alkali 溶液은 0.2 M glycine-NaOH buffer로 pH 7.0, 8.4, 10.2, 12.0 등 4종류의 溶液으로 조제하고 純粹分離 冷凍乾燥한 內毒素蛋白質 5 mg을 위의 溶液 0.5 ml에 혼합한 후 각각 28°C, 5시간씩 溶解시켰다. 이 溶液을 0.2 ml씩 취하여 0.3 ml의 Sample buffer (0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% SDS, 2% β-mercaptoethanol (pH 7.0)을 가하여 100°C, 3분간 加熱한 후 室溫에서 냉각시켜 0.05% bromophenol blue와 50% glycerol이 함유된 Phosphate buffer(pH 8.8)로 만든 tracking dye 50 μl를 가하여 泳動用試料로 사용하였다.

0.1% SDS를 함유한 polyacrylamide는 Laemmli (1970) 方法에 따라 15×15×0.2 cm 크기의 disc slab gel을 作成하여 각 slot當 20 μl의 試料를 loading시킨 뒤 室溫에서 15 mA 電流에서 30분, 20 mA 電流에서 8시간 동안 行하였다. 泳動槽로부터 分離한 gel은 methanol, acetate, 증류수(22.7 : 4.6 : 50) 混合液에 녹인 0.25%(w/v) Coomassie brilliant Blue 溶液으로 50°C에서 4시간 染色한 후 methanol, acetate, 증류수(25 : 7.5 : 67.5) 混合液으로 24~28시간 脫色시켜 densitometer로 그 band를 確認하였다.

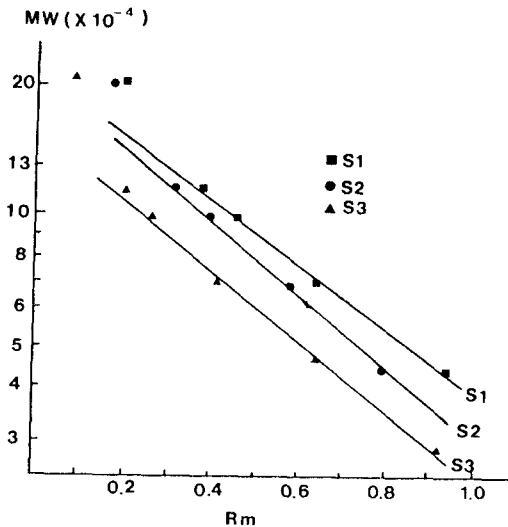


Fig. 1. Electrophoretic mobilities of standard proteins as a function of the acrylamide concentration in the gel.

The acrylamide concentration illustrated are 7%(S1), 7.5%(S2), 10%(S3). Molecular weight of proteins are as follows : carbonic anhydrase (29,000), egg albumin (45,000), bovine serum albumin (66,000), phosphorylase B (97,400), β-galactosidase (116,000), myosin (205,000).

消化液으로處理한 경우는 冷凍保管된 昆蟲消化液을 4°C에서 溶解시킨 뒤, 0.3 ml를 취해 3 mg의 内毒素蛋白質과 混合하여 각각 1시간 또는 5시간 동안 37°C에서 incubation한 다음 위 alkali 용액과 동일한 방법으로 電氣泳動을 行하였다.

Alkali 溶液과 昆蟲消化液에 의해 分離된 結晶 内毒素蛋白質의 分子量은 SDS-molecular weight protein marker(Sigma MW-SDS-200 : Myosin : 20.5 kDa, β-Galactosidase : 11.6 kDa, Phosphorylase B : 9.74 kDa, Albumin bovine : 6.6 kDa, Albumin egg 4.5 kDa, Carbonic Anhydrase : 2.9 kDa)를 이용하여 7, 7.5, 10%의 SDS-polyacrylamide slab gel에서 20 mA 電流로 8시간 동안 전기영동하여 상대적인 이동도를 X축으로 하고, 分子量의 log값을 Y축으로 하여 gel 농도에 따라 각각의 표준직선  $Y=1.3357-0.8792X$ ,  $Y=1.3390-0.7517X$ ,  $Y=1.1997-0.8173X$ 를 구하고 이 式으로부터 蛋白質의 分子量을 決定하였다(그림 1).

結果 및 考察

Alkali 處理液의 pH 變化에 따른 内毒素蛋白質의 分解像을 調査하기 위해 10% SDS-PAGE로 분석하고 泳動像을 調査한 결과는 그림 2~5와 같다.

BT의 protein의 分子量은 *B. thuringiensis* var. *aizawai*는 134 kDa, *B. thuringiensis* var. *kurstaki*는 143 kDa와 139 kDa의 2개, *B. thuringiensis* var. *dendrolimus*는 149 kDa와 141 kDa으로 각각 主 band가 나타나 Nickerson 등(1980)이 報告한(内毒素蛋白質 subunit와는 分子量에서 약간의 差異를 나타내고 있으나) 것과 같이 비슷한 像을 보여 주었으며, 이외에 *B. thuringiensis* var. *aizawai*와 *B. thuringiensis* var. *kurstaki*에서는 98 kDa, 64 kDa의 低分子의 微band가 나타났으나 이는 處理 손상받는 것으로 추정된다(그림 5B).

각각 pH가 서로 다른 alkali 溶液으로 處理한 경우는 pH가 增加함에 따라 3菌株 모두 内毒素蛋白質 subunit가 分解되는 것을 그림 2~4에서 觀察할 수 있었다. Alkali에 의한 内毒素蛋白質의 分解는 Bullar 등(1981)의 報告에 의하면 内毒素蛋白質에는 alkali에 의해 活性化되는 sulfurhydryl의 蛋白質分解酵素가 존재하여 이들 酵素의 作用에 의해 일어나는 것으로 보고하고 있다. 本 實驗의 結果에서도 pH 7.0에서 分子量이 대략 130 kDa의 主蛋白質이 pH 8.4 이상에서는 120 kDa 사이로 移動되어져 나타났고, 이외에 95 kDa, 80 kDa, 그리고 65 kDa으로 주위에 여러 개의

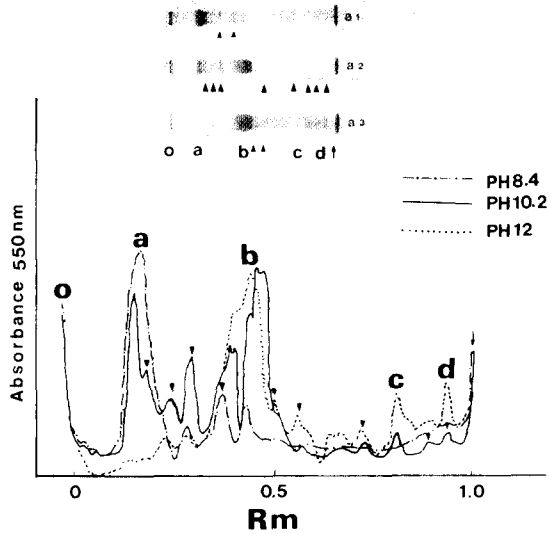


Fig. 2. Stained gels and densitometer scans of alkali solubilized parasporal crystal proteins of *B. thuringiensis* var. *aizawai*.

Solubilization was carried out in 0.2 M glycine-NaOH buffer as a function of pH at 28°C for 5 hours. pH of alkali buffer illustrated are 8.4(a1), 10.2(a2), 12(a3). Electrophoresis in 10% polyacrylamide containing 0.1% SDS prepared according to the method of Laemmli was performed at 20 mA constant current for 8 hours. 20 μl of sample was applied to each gel. Staining was with 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue. Symbols; (O) Origin, (a) M.W. 124,000×(b) 65,000×(c) 43,000×(d) 29,000. Arrow with bar indicates point of migration of tracking dye during electrophoresis.

微band가 出現하고 있으며 pH가 10.2로 增加함에 따라 主band가 減少하는 반면 이들 微band들이 增加하며 pH 12에서는 *B. thuringiensis* var. *aizawai* 65 kDa, *B. thuringiensis* var. *dendrolimus* 66 kDa, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 66 kDa이 主band로 나타남과 동시에 一部分은 分解되어 57 kDa에서 45 kDa 사이에 새로운 微band로 出現하고 있다.

이상의 結果를 綜合적으로 檢討해 볼때 alkali 處理에서 各菌株間의 主band의 差異는 SDS와 β-mercaptoethanol 處理時 나타나는 native subunit와는 달리 뚜렷한 差異를 찾을 수 없으며, 단지 *B. thuringiensis* var. *aizawai*, *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, *B. thuringiensis* var. *dendrolimus*順으로 分解速度的 差異와 微band數에서만 약간의 差異가 인정되었다(그림 2~4).

그림 5B에서 보는 바와 같이 처리하지 않은 내독 소단백질은 순수한 11개의 band만 나타나는 現象은

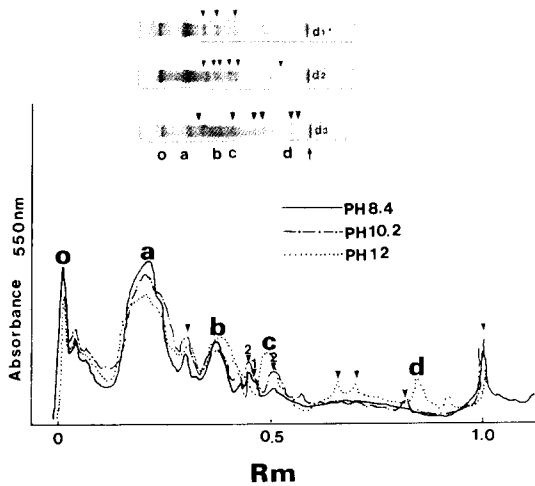


Fig. 3. Stained gels and densitometer scans of alkali solubilized parasporal crystal proteins of *B. thuringiensis* var. *dendrolimus*.

Solubilization was carried out in 0.2 M glycine-NaOH buffer as a function of pH at 28°C for 5 hours. pH of alkali buffer illustrated are 8.4(d1), 10.2(d2), 12(d3). Electrophoresis in 10% polyacrylamide containing 0.1% SDS prepared according to the method of Laemmli was performed at 20 mA constant current for 8 hours. 20  $\mu$ l of sample was applied to each gel. Staining was with 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue.

Symbols; (O) Origin, (a) M.W. 129,000, 123,000 (b) 79,000 (c) 66,000, 61,000 (d) 30,100. Arrow with bar indicates point of migration of tracking dye during electrophoresis.

*B. thuringiensis* 内毒素蛋白質에 대하여 Labow(1964)가 報告한 바와 같이 polypeptide subunit로 構成되어져 있다고 볼 수 있으며, 그 分子量은 變異株마다 약간의 差異를 보이나, 대개 130~150 kDa 정도의 것으로 보고되었다. 또한 Haider과 Mahmood(1990)는 BT 13균주의 내독소단백질의 protein을 조사한 결과 125~144 kD의 그룹으로 나타내었다. Alkali 處理時 그림 5A에서 이들 内毒素蛋白質의 subunit 分子量이 120~130 kDa으로 낮게 나타나는 것은 Bulla(1977)의 研究報告와 같이 peptide에 부착된 glucose 등의 carbohydrate 物質이 alkali에 의해 分解되기 때문에 일어난 것으로 추정된다. 또한 pH 10.2에서 分子量 110 kDa과 70 kDa 사이에 나타나는 多數의 蛋白質 band는 pH가 增加하여 12에 이르면 減少되는 현상으로 미루어 볼 때 分解過程中에 生成되는 intermediate로 생각되어진다. 특히, pH 12에서도 비교적 安定性を 보이는 分子量 60~68 kDa의 band는 Ya-

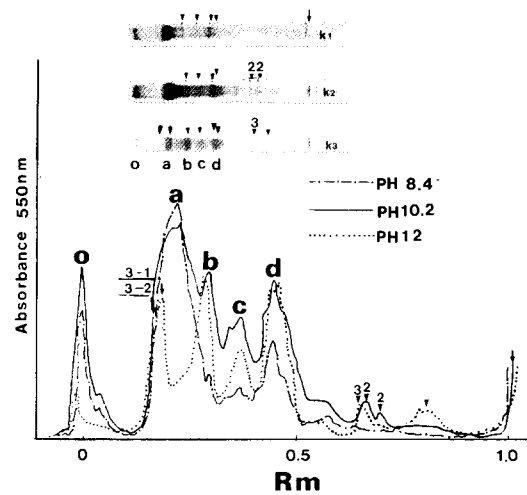


Fig. 4. Stained gels and densitometer scans of alkali solubilized parasporal crystal proteins of *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

Solubilization was carried out in 0.2 M glycine-NaOH buffer as a function of pH at 28°C for 5 hours. pH of alkali buffer illustrated are 8.4(K1), 10.2(K2), 12(K3). Electrophoresis in 10% polyacrylamide containing 0.1% SDS prepared according to the method or Laemmli was performed at 20 mA constant for 8 hours. 20  $\mu$ l of sample was applied to each gel. Staining was with 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue.

Symbols; (O) Origin, (a) M.W. 128,000 (3-1), 123,000 (3-2), (b) 98,000 (c) 86,000 (d) 66,000, 63,000. Arrow with bar indicates point of migration of tracking dye during electrophoresis.

mamoto 등(1981)이 報告한 것과 같은 protease resistant core로 추정되어지고, 이들 core 蛋白質은 pH 12에서 일부 分解가 일어나 시간이 경과함에 따라 그 보다 낮은 分子量을 갖는 45~30 kDa의 peptide로 變換되어졌다.

배추흰나비, 누에 및 흰불나방의 消化液에 의한 内毒素蛋白質의 分解像을 비교하기 위해 内毒素蛋白質을 37°C에서 1시간 處理한 結果를 볼 때 alkali 處理時 나타났던 대부분의 band들이 사라지고 *B. thuringiensis* var. *aizawai*는 61 kDa, 59 kDa 및 58 kDa의 3개의 band, *B. thuringiensis* var. *kurstaki*는 60 kDa, 57 kDa의 2개의 band만이 나타났으며, *B. thuringiensis* var. *dendrolimus*는 129 kDa, 123 kDa, 62 및 60 kDa의 주band 4개와 多數의 微band가 나타나는 것을 確認할 수 있었다.

이는 alkali 處理時와 같이 消化液에서 蛋白質 分

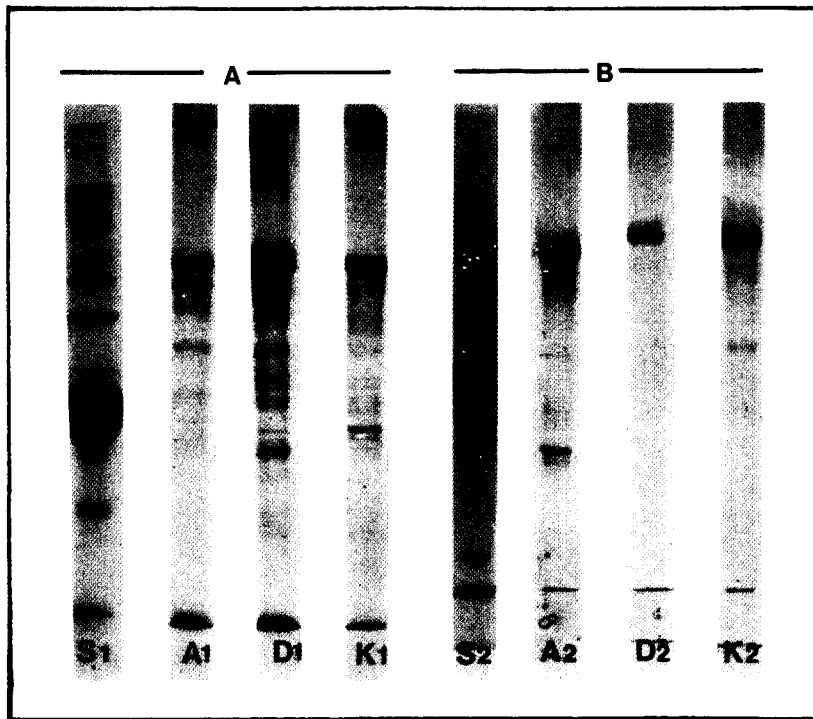


Fig. 5. Stained gels of standard marker proteins and parasporal crystal proteins of *B. thuringiensis* var. *aizawai*, *B. thuringiensis* var. *dendrolimus* and *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

(A) Parasporal crystal proteins were incubated in 0.2 M glycine-NaOH buffer (pH 10.2) for 1 hr. The protein samples were dissolved in 1% SDS, 2% β-mercaptoethanol in 0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 7.0) and heating to 100°C for 3 min. 20 μl of sample was applied to 7.5% polyacrylamide gel containing 0.1% SDS prepared according to the method of Laemmli Electrophoresis was carried out at 20 mA constant current for 8 hours. Staining was with 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue.

(B) Same as (A) except parasporal crystal proteins were not treated with alkaline sol and electrophoresis gel concentration was 7%. Lanes illustrated are (S1, S2) standard markers proteins (see Fig. 5), (a1, a2) *B. thuringiensis* var. *aizawai*, (d1, d2) *B. thuringiensis* var. *dendrolimus* and (k1, k2) *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

解速度差는 *B. thuringiensis* var. *dendrolimus*가 가장 느린 것으로 추정된다. 時間의 경과에 따른 變化傷은 5시간이 지난 후의 電氣泳動傷에서 確認할 수 있었는데(그림 7), 시간이 경과함에 따라 alkali 處理時의 pH가 增加하는 것과 같은 效果를 볼 수 있다. 즉, 60 kDa 주위의 band들이 分解되어 *B. thuringiensis* var. *kurstaki*는 59, 57, 49 kDa의 새로운 band가 나타났으며, *B. thuringiensis* var. *alzawai*에서는 65 kDa으로 그림 6과 비교할 때 1개의 band가 사라졌고, *B. thuringiensis* var. *dendrolimus*에서는 원래의 主band 이외에 59 kDa, 55, 45 및 44 kDa의 band가 나타났다.

배추흰나비 消化液으로 處理한 *B. thuringiensis* 內毒素蛋白質이 分解像은 흰불나방과 거의 같은 泳動像을 나타내었으나, 누에의 消化液의 分解速度에

있어서 그림 7B에서 보여주는 것과 같이 前記의 두 供試昆蟲과는 달리 다른 菌株들에 비해 *B. thuringiensis* var. *kurstaki*가 느리게 나타나는 差異를 보였다.

이상의 結果로 볼 때 *B. thuringiensis*의 內毒素蛋白質이 3종류의 곤충소화액에서 별다른 분해상의 차이를 나타내지 않았으며 또한 시험한 3종류 변이균주의 내독소단백질에도 거의 차이가 없는 것으로 나타났다. 이는 Cooksey(1968) 등의 보고와 거의 일치한다.

### 摘 要

害蟲의 微生物的 防除을 위하여 *Bacillus thuringiensis* 殺蟲劑(BT제) 開發에 관한 基礎資料를 얻고자

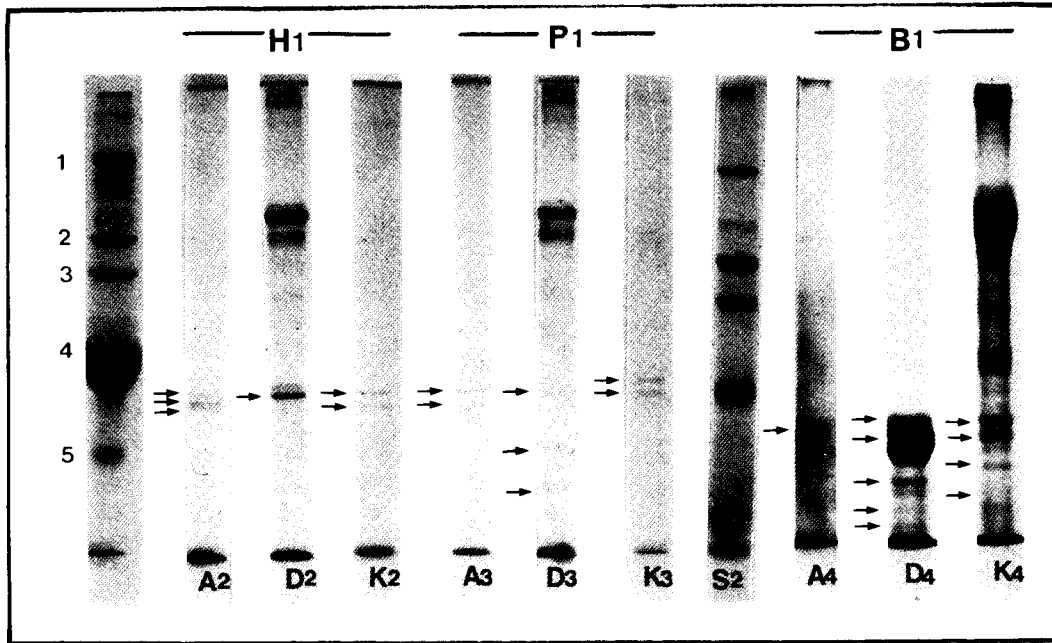


Fig. 6. Stained gels of standard marker proteins and parasporal crystal proteins of *B. thuringiensis* var. *aizawai*, *B. thuringiensis* var. *dendrolimus* and *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

(H1) Parasporal crystal proteins were incubated in *H. cunea* gut juice at 37°C for 1 hour. The sample proteins were dissolved in 1% SDS, 2%  $\beta$ -mercaptoethanol in 0.01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer (pH 7.0) and heating to 100°C for 3 min. 20  $\mu\text{l}$  of sample was applied to 7.5% polyacrylamide gel containing 0.1% SDS prepared according to the method of Laemmli. Electrophoresis was carried out at 20 mA constant current for 8 hours. Staining was with 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue.

(P1) Same as (H1) except parasporal crystal proteins were incubated in *P. rapae* gut juice.

(B1) Same as (H1) except parasporal crystal proteins were incubated in *B. mori* gut juice and gel concentration was 7%. Lanes illustrated are (S1, S2) standard marker proteins (see Fig. 5), (A2, A3, A4) *B. thuringiensis* var. *aizawai*, (D2, D3, D4) *B. thuringiensis* var. *dendrolimus* and (K2, K3, K4) *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

3균주의 공시균주인 *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, *B. thuringiensis* var. *dendrolimus*, *B. thuringiensis* var. *aizawai*와 3종의 供試蟲으로 누에, 흰불나방, 배추흰나비의 유충을 이용하고, *B. thuringiensis* 内毒素蛋白質을 alkali溶液 또는 供試된 3종의 昆蟲消化液으로 處理하여 電氣泳動을 比較하여 아래와 같은 結果를 얻었다.

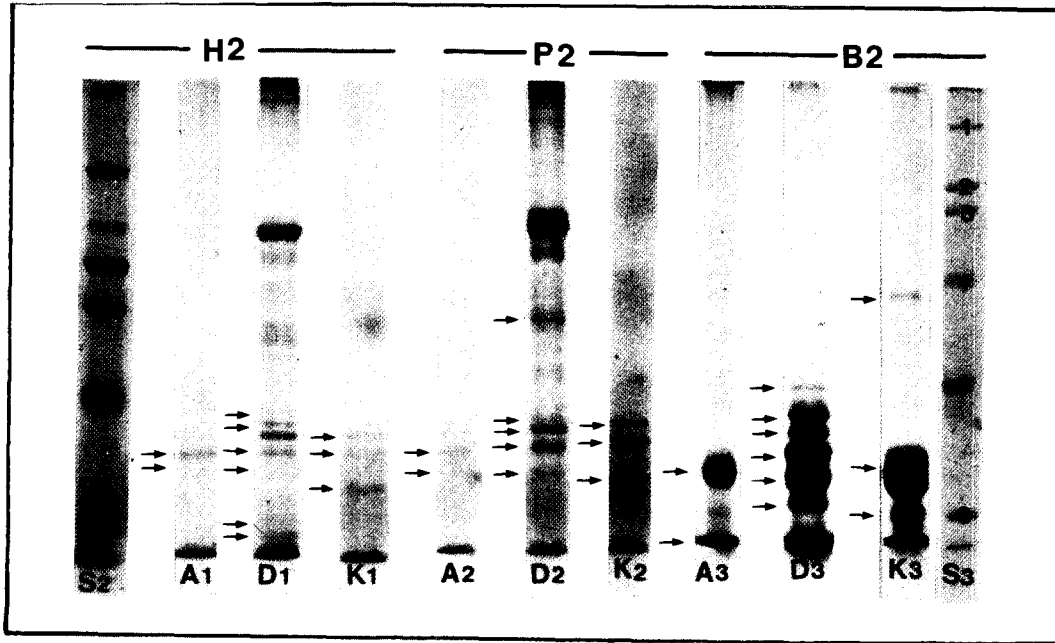
1. 3균주의 *B. thuringiensis*에서 생산된 내독소단백질은 alkali 또는 곤충의 소화액 처리에 따라서 변화되는 뚜렷한 차이가 없는 것으로 나타났다.

2. 각 균주의 内毒素蛋白質의 分子量은 *B. thuringiensis* var. *aizawai*가 130 kDa, *B. thuringiensis* var. *kurstaki*가 140 kDa, 130 kDa, 그리고 *B. thuringiensis* var. *dendrolimus*가 140 kDa의 부분에 2band로 나타났으며, 이들 内毒素蛋白質은 alkali 溶液이나 宿主昆

蟲의 消化液으로 處理時 活性化 되어 40~65 kDa의 低分子 蛋白質로 轉換되었다. 또한 宿主昆蟲消化液에 따라 内毒素蛋白質의 活性化 速度에 약간의 差異가 있는 것으로 確認되었다.

## 引用 文 獻

- Angus, T. A. (1956) Association of toxicity with protein crystalline inclusions of *Bacillus thuringiensis* Ishiwata. *Can. J. Microbiol.* 2 : 122-131.
- Angus, T. A. and Norris, J. R. (1968) A comparison of the toxicity of some varieties of *Bacillus thuringiensis* Berliner for silkworm larvae. *J. Invert. Pathol.* 11 : 289-295.
- Bulla, L. A., Kramer, K. J., Cox, D. J., Jones, B. L., Davidson, L. I. and Lookhart, G. L. (1981) Purifica-



**Fig. 7.** Stained gels of standard marker proteins and parasporal crystal proteins of *B. thuringiensis* var. *aizawai*, *B. thuringiensis* var. *dendrolimus* and *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

(H2) Parasporal crystal proteins were incubated in *H. cunea* gut juice at 37°C for 5 hours. The sample proteins were dissolved in 1% SDS, 2%  $\beta$ -mercaptoethanol in 0.01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer (pH 7.0) and heating to 100°C for 3 min. 20  $\mu\text{l}$  of sample was applied to 7% polyacrylamide gel containing 0.1% SDS prepared according to the method of Laemmli. Electrophoresis was carried out at 20 mA constant current for 8 hours. Staining was with 0.25% (w/v) Coomassie brilliant Blue.

(P2) Same as (H2) except parasporal crystal proteins were incubated in *P. rapae* gut juice.

(B2) Same as (H2) except parasporal crystal proteins were incubated in *B. mori* gut juice and gel concentration was 10%. Lanes illustrated are (S2, S3) standard marker proteins (see Fig. 5). (A1, A2, A3) *B. thuringiensis* var. *aizawai*, (D1, D2, D3) *B. thuringiensis* var. *dendrolimus* (K1, K2, K3) *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

tion and characterization of entomocided protein of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **256** : 3000-3004.

**Cooksey, K. E.** (1971) The protein crystal toxin of *Bacillus thuringiensis* : Biochemistry and mode of action. pp. 247-274 in H.

**DeBajac, H. and Bonnefoi, A.** (1962) Essai de classification biochimique et serologique de 24 souches de *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga* **7** : 5-31.

**Elmerich, C. and Aubert, J. P.** (1975) In spores VI, P. Gerhardt, R. N. Costilow and H. L. Sadoff (eds.), American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp. 385-390.

**Faust, R. M., Adams, J. R. and Heimpel, A. M.** (1967) Dissolution of the toxic parasporal crystals from *Bacillus thuringiensis* var. *pacificus* by the gut secretions of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.* **9** : 488-499.

**Hannay, C. L.** (1953) Crystalline inclusion in aerobic sporeforming bacteria. *Nature*(London) **172** : 1004.

**Haider, M. Z. and Mahmood, S.** (1990) *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxin : Diversity of crystal proteins and its relatedness to the toxicity spectrum. *J. Basic. Microbiol.* **30** : 251-258.

**Hofmann, C., Luthy, P., Hutler, P. and Pliska, V.** (1988) Binding of the delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur. J. Biochem.* **173** : 85-91.

**Kim, Y. H., Kim, S. H. and Kang, S. K.** (1991) Purification of Parasporal protein crystals of *Bacillus thuringiensis*. *Korean. J. Seric. Sci.* **33** : 32-36.

**Labaw, L. W.** (1964) The structure of *Bacillus thuringiensis* Beliner crystals. *J. Ultrastruct. Res.* **10** : 66-75.

**Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins

- during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)* **227** : 680-685.
- Lecadet, M. M. and Dedonder, R.** (1966) Les protease de *Pieris brassicae* I. Purification et proprietes. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **48** : 631-660.
- Lecadet, M. M. and Dedonder, R.** (1967) Enzymatic by hydrolysis of the crystals of *Bacillus thuringiensis* by the proteases of *Pieris brassicae*. I. Preparation and fractionation of the lysates. *J. Invertebr. Pathol.* **9** : 310-321.
- Lecadet, M. M. and Martouret, D.** (1967) The enzymatic hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* berliner crystals, and the liberation of toxic fractions of bacterial origin by the cycle of *Pieris brassicae* (Linnaeus). *J. Invertebr. Pathol.* **7** : 105-108.
- Yamamoto, T. and McLaughlin, R. E.** (1981) Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* toxic to the mosquito larva, *Aedes taeniorhynchus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **103** : 414-421.